

## Zur Frage der Wirkung von DTPA auf Säugerchromosomen in vitro

Die Frage, ob Chelatbildner Chromosomenschäden bewirken, ist in den letzten Jahren von einer Reihe von Autoren unterschiedlich beantwortet worden. Danach erhöhen Na-diäthyldithiocarbamat (DIECA), 8-Hydroxyquinolin, KCN, Cupferron, 2,2-Bipyridin (BP), 1,2-3,4-Diepoxybutan (DEB) und Kombinationen von KCN, BP und DEB die Aberrationsrate in *Vicia faba* Wurzelspitzenzellen<sup>1,2</sup>.

Die Äthylendiamintetraessigsäure (ÄDTA) ruft vermehrt Brüche in Chromosomen von Speicheldrüsenzellen von *Drosophila melanogaster* und in Meristemzellen von *Allium cepa* hervor<sup>3</sup>. Andererseits finden sich in menschlichen Leukozyten nach Behandlung mit Desferrioxamin B (DFOA) und Penicillamin (PA) keine Chromosomenschäden<sup>4</sup>. Es ist daher von Interesse zu prüfen, ob therapeutisch besonders wichtige Chelatbildner, die z.B. zur Dekorporation von Radionukliden eingesetzt werden, die spontanen Aberrationsraten bei Säugerzellen erhöhen können. Zu dieser Gruppe von Substanzen gehört die Diäthylen-triaminpentaessigsäure (DTPA)<sup>5</sup>.

2-3 Tage alte Zellen einer Monolayerkultur eines bei uns seit Jahren gehaltenen Subklons der Chinesischen Hamsterzelllinie B14 F28 dienten als Versuchsmaterial. Die Zellen wurden mit Ca-Na-DTPA-Konzentrationen von  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  und  $10^{-3} M$  – gelöst im verwendeten Mc Coy-5a-Medium- 4, und im Falle von  $10^{-3} M$  auch 8 h lang behandelt. Die zur Metaphasenreicherung notwendige Colcemidbehandlung dauerte 4 h, anschliessend erfolgte die Spreitung der Metaphaseplatten nach der air-dry-Methode. Für jeden Aberrationsratenwert von behandel-

ten Zellen wurden insgesamt 300-400 gut gespreitete Metaphaseplatten ausgewertet, bei den jeweiligen Kontrollen 200.

Die Berechnungen der Aberrationsraten beruhen also auf mindestens 200 Metaphaseplatten pro Wert. Die Auswertung der Aberrationen umfasste Chromatid- und Isochromatidbrüche sowie gaps. Komplexe Konfigurationen wie exchanges, Ringe, dizentrische Chromosomen traten im Gesamtmaterial nur vereinzelt auf und wurden nicht erfasst. Die Ergebnisse, die in der Tabelle dargestellt sind, zeigen keinen statistisch sicherbaren Unterschied zwischen den 4-Stunden-Werten aus den Versuchen mit  $10^{-3}$  und  $10^{-2} M$  DTPA. ( $P_{\chi^2} > 0,05$ ; berechnet aus der tatsächlichen Gesamtzahl ungeschädigter und geschädigter Chromatiden in 200, 300 oder 400 Zellen). Nach Behandlung mit der  $10^{-1} M$ -Konzentration traten die meisten Zellen nicht mehr in die Mitose ein bzw. starben noch unter der Behandlung ab. Die höchste tolerierte Dosis liegt also demnach hier zwischen  $10^{-2}$  und  $10^{-1} M$ . Die sichere Bestimmung von Aberrationsraten ist nach Behandlung mit  $10^{-1} M$  DTPA nicht mehr mög-

<sup>1</sup> B. A. KIHLMAN, J. Biophys. biochem. Cytol. 3, 363 (1957).

<sup>2</sup> N. S. COHN, Expl. Cell Res. 24, 596 (1961).

<sup>3</sup> B. P. KAUFMANN und R. McDONALD, Proc. natn. Acad. Sci. 43, 262 (1957).

<sup>4</sup> B. K. VIG und E. J. EYRING, Mutation Res. 12, 214 (1971).

<sup>5</sup> A. CATSCH, Dekorporierung radioaktiver und stabiler Metallionen (Karl Thieme KG, München 1968).

### Brüche bzw. Aberrationen pro Zelle

Experiment Nr.	DTPA <i>M</i> -Konz.	Behand- lungszeit (h)	Anzahl Zellen	a) Gaps	b) Brüche	a) + b) = Aberra- tionen	Brüche pro Zelle	Aberrationen pro Zelle
1a	0	–	100	2	2	4	0,020	0,040
1b	0	–	100	2	4	6	0,040	0,060
1a + 1b	0	–	200	4	6	10	0,030	0,050
1a	$10^{-3}$	4	100	2	4	6	0,040	0,060
1b	$10^{-3}$	4	100	5	3	8	0,030	0,080
1b	$10^{-3}$	4	100	4	7	11	0,070	0,110
1a + 1b	$10^{-3}$	4	300	11	14	25	0,047	0,083
2a	0	–	100	1	2	3	0,020	0,030
2b	0	–	100	4	1	5	0,010	0,050
2a + 2b	0	–	200	5	3	8	0,015	0,040
2a	$10^{-3}$	8	100	2	2	4	0,020	0,040
2a	$10^{-3}$	8	100	3	1	4	0,010	0,040
2b	$10^{-3}$	8	100	1	3	4	0,030	0,040
2b	$10^{-3}$	8	100	4	2	6	0,020	0,060
2a + 2b	$10^{-3}$	8	400	10	8	18	0,020	0,045
3a	0	–	100	4	3	7	0,030	0,070
3b	0	–	100	4	3	7	0,030	0,070
3a + 3b	0	–	200	8	6	14	0,030	0,070
3a	$10^{-2}$	4	100	1	5	6	0,050	0,060
3a	$10^{-2}$	4	100	1	6	7	0,060	0,070
3b	$10^{-2}$	4	100	4	2	6	0,020	0,060
3b	$10^{-2}$	4	100	1	7	8	0,070	0,080
3a + 3b	$10^{-2}$	4	400	7	20	27	0,050	0,068

Brüche = Chromatid- + Isochromatidbrüche.

lich. Auch zwischen den 4- und 8-Stunden-Werten der Konzentration  $10^{-3}$  ist kein statistisch sicherbarer Unterschied vorhanden ( $p\chi^2 \gg 0,05$ ; berechnet wie oben angegeben). Das bedeutet, dass DTPA unter diesen Versuchsbedingungen keine Erhöhung von Chromosomenaberrationsraten induziert.

Therapeutisch ist die in Anwendung kommende Konzentration von  $10^{-3}$  bereits an der Grenze der Verträglichkeit. Um so mehr ist der Befund interessant, dass nicht nur diese Konzentration, sondern auch diejenige von  $10^{-2} M$  keine Aberrationen hervorzurufen vermag.

Aus diesen Ergebnissen – wie aus denen nach DFOA- und PA-Behandlung<sup>4</sup> – ist zu schliessen, dass ein Metallionenentzug aus den Zellen, und damit unter Umständen auch aus der Chromosomenstruktur, nicht zur Erhöhung der Chromosomenbruchrate zu führen braucht. Der in der vorliegenden Untersuchung verwendete Zellklon hat eine Generationszeit von 15–16 h und dabei eine  $G_0$ -Phase von 4–5 h<sup>6</sup>. Demnach sind in den Versuchen mit 4-Stunden-Behandlung praktisch nur  $G_2$ -Zellen ausgewertet worden. Weitere Versuche mit anderen Zellzyklusstadien sind wünschenswert, zumal eine mit den Zellzyklusstadien korrelierbare Verteilungsänderung von Metallionen in

Zellen nachgewiesen wurde<sup>7</sup>. Sollten außerdem in vivo Untersuchungen mit Knochenmarkszellen und Lymphozyten die in vitro Befunde mit DTPA bestätigen, dann könnten beim praktischen Einsatz genetische Bedenken entkräftet werden<sup>8</sup>.

*Summary.* The influence of DTPA on the chromosome aberration rate of Chinese hamster cells in culture was studied. No increase of the aberration rate was observed after treatment with  $10^{-2}$  and  $10^{-3} M$  concentrations.

H. G. MILTENBURGER und U. BAUER

Zoologisches Institut der Technischen Hochschule  
Darmstadt (Deutschland), Schnittspahnstrasse 3  
4. Februar 1972.

<sup>6</sup> H. G. MILTENBURGER, Strahlentherapie 138, 5 (1969).

<sup>7</sup> E. ROBBINS und T. PEDERSON, Proc. natn. Acad. Sci. 66, 1244 (1970).

<sup>8</sup> Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

### Muntjac Chromosomes: A New Karyotype for *Muntiacus muntjak*

The evolutionary history of the primitive muntjac deer (Muntiacinae) and karyotypes of two species of the genus *Muntiacus* have been described<sup>1</sup>. The taxonomy of *Muntiacus* is not complex, only 5 species being listed by ELLERMAN and MORRISON-SCOTT<sup>2</sup>. This study is concerned with *Muntiacus muntjak*, commonly called Indian muntjac, of which there are 8 subspecies listed<sup>2</sup>.

Previous chromosome analyses on *M. muntjak*<sup>1</sup> were performed on offspring of stock captured in Assam. These animals are considered, on the basis of geographical range, to be *M. muntjak vaginalis*. The diploid number of chromosomes is 7 in the male and 6 in the female; both sexes carry an *X* to autosome translocation.

Chromosome analysis has now been done on a female muntjac captured near Kuala Lumpur, Malaysia, and considered on the basis of geographic range to be *Muntiacus muntjak muntjak*. Preparations were made from a fibroblast culture grown from skin explants cultured in McCoy's 5A (modified) medium enriched with 20% fetal calf serum. This animal has a diploid number of 8 (Figure 1) with an *X* to autosome translocation confirmed by the use of autoradiography. A diploid number of 9 would be expected in the male of this subspecies. A karyotype of *M. muntjak vaginalis* shows in Figure 2. In *M. muntjak muntjak* the No. 1 pair of large metacentrics found in *M. m. vaginalis* is replaced by a pair of large submetacentrics and a pair of acrocentrics. The *X* chromosome, exclusive of the autosome to which it is fused, equals  $9.17 \pm$

0.86% by weight of the haploid complement, as determined by the photo cutout method<sup>3</sup>. This value is similar to that of the Indian animal reported previously to be 9.3%<sup>1</sup>.

DNA values have been determined on the female from Malaysia and on 1 male *M. m. vaginalis*. Determinations were made on 35 Feulgen stained fibroblasts and compared to 35 human lymphocytes analyzed simultaneously as controls. Measurements were made with a Deeley Integrating Microdensitometer. DNA value for the *M. muntjak vaginalis* was  $0.724 \pm 0.012$ , for the *M. muntjak muntjak* was  $0.948 \pm 0.029$  and for two specimens of *M. reevesi* was  $0.894 \pm 0.033$  of the human value.

Karyotype evolution and chromosome homology are intriguing problems in the muntjacs. The Chinese or Reeve's muntjac (*M. reevesi*) has a diploid number of 46 and all the autosomes are acrocentric<sup>4</sup>. Neither evolution of the karyotype of *M. muntjak* from that of *M. reevesi*, or vice versa, nor the karyotype of a common ancestor can be easily imagined. Transition of karyotypes from that

<sup>1</sup> D. H. WURSTER and K. BENIRSCHKE, Science 168, 1364 (1970).

<sup>2</sup> J. R. ELLERMAN and T. C. S. MORRISON-SCOTT, *Checklist of Palaearctic and Indian Mammals* (Tonbridge, Kent, England 1951).

<sup>3</sup> D. H. WURSTER, J. R. SNAPPER, K. BENIRSCHKE, Cytogenetics 10, 153 (1971).

<sup>4</sup> D. H. WURSTER and K. BENIRSCHKE, Cytologia 32, 273 (1967).

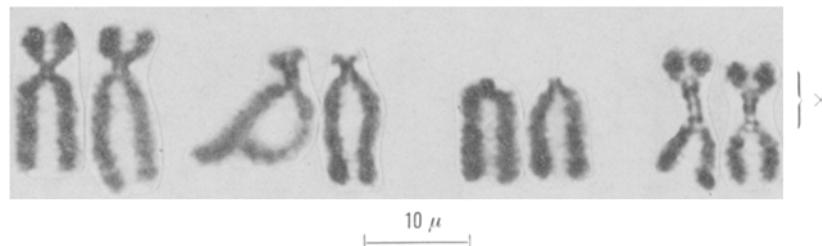


Fig. 1. Karyotype of *Muntiacus muntjak muntjak*.  $\times 1600$ .